

総 説 (2019年度横浜市立大学医学研究奨励賞受賞論文)

HIV複製を制御する宿主タンパク質の探索と
そのメカニズム解析

宮 川 敬

横浜市立大学医学部 微生物学

要 旨: ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の病原ウイルスである。HIVは免疫系をさまざまな手段で回避し、CD4陽性T細胞やマクロファージなどに感染すると自身のゲノムを宿主の染色体へ組み込む。そして大量のウイルスを細胞膜から出芽させ、細胞死を誘発しながら次々と感染を拡げていく。この一連の過程には宿主、つまりヒトのタンパク質が深く関わっている。自己増殖能のないウイルスが、感染細胞内のヒトのタンパク質の機能を巧みに利用して効率的な複製を実現するよう進化したためである。我々はここ数年、ウイルスタンパク質と相互作用するヒトタンパク質をさまざまな技術を用いて網羅的に探索し、HIVが細胞内で複製できる仕組みを解明してきた。本稿では我々の研究によって明らかになったウイルス側の巧みな戦略、そしてそれを利用した新薬の可能性について概説する。

Key words: ウイルス-宿主相互作用 (Virus-Host interaction), 生体防御因子 (Antiviral proteins), 翻訳後修飾 (Posttranslational modifications)

I. はじめに

自己増殖能のないウイルスがヒトの体内で効率よく増えるためには、感染したヒト細胞内でヒトのタンパク質の機能をうまく利用するしかない。ウイルスタンパク質はヒトのタンパク質と結合することによって、複雑な細胞質の中を移動したり、自身の機能を活性化させたりする。また、時には抗ウイルス活性を示すヒトタンパク質を不活化したり分解したりすることもある。これはHIVだけの特徴でなく、多くのウイルスも同様である。こうした「ウイルス-宿主タンパク質相互作用」を明らかにすることは、学術的な知見を得られるだけでなく、新薬を開発する上で重要なエビデンスとなる。我々はここ数年、横浜市立大学の有するさまざまな技術を用い、ウイルスタンパク質と機能的に相互作用するヒトタンパク質を探索してきた。その知見の一部を紹介する。

II. HIVのcell-to-cell感染に関わる宿主因子APC

HIVの感染伝播様式は、大きく2つある。細胞外に浮遊しているウイルス粒子が細胞に吸着、結合して感染する「cell-free感染」と、隣接し合う感染細胞から非感染細胞に直接ウイルスを受け渡す「cell-to-cell感染」がある(図1)。cell-to-cell感染は細胞外にウイルスが浮遊することがないため、一般的にcell-free感染に比べ数十倍～数千倍も高い効率でウイルスを直接伝播することが可能である¹⁾。HIVによるcell-to-cell感染は、特にHIVの標的となるCD4陽性Tリンパ球が高密度に存在する腸管関連リンパ組織などの2次リンパ組織において主要な感染伝播様式であり、潜伏化や長期感染維持においても重要な役割を果たすことが報告され、近年注目を集めている²⁾。cell-to-cell感染は、細胞生物学的には細胞と細胞の接合部に存在するVirological Synapse (VS) と呼ばれる特殊な構造体を介して起こる。VSはウイルスの受け渡し場所としての役割を果たしているため、HIVの効率的な伝播には、

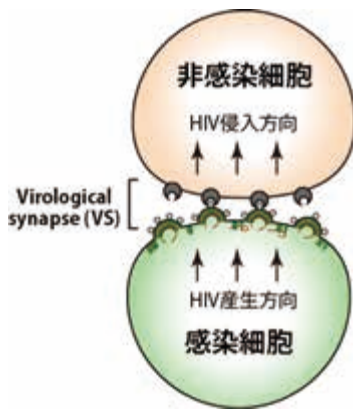


図1. HIVのcell-to-cell感染

Virological Synapse (VS) という構造体を介して隣接し合う感染細胞から非感染細胞に直接ウイルスを受け渡す感染様式。

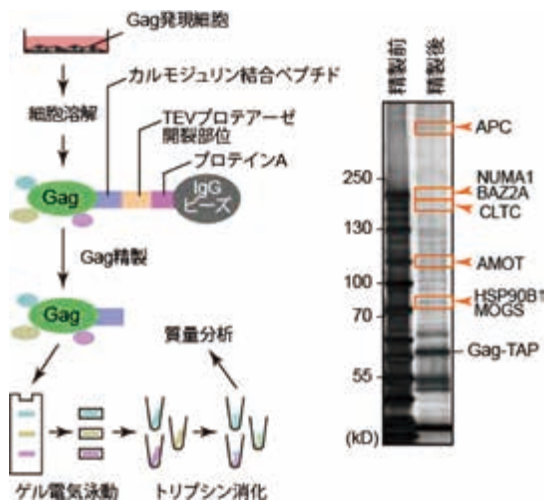


図2. Gag結合タンパク質の同定

Gagを発現した細胞からTAP法を用いてGag結合タンパク質を精製し、質量分析を行った。APCを含む多数のGag結合タンパク質を同定した。

ウイルスの基本構成要素（構造タンパク質Gag）やウイルスゲノム（vRNA）をVSまで輸送することが重要である³⁾。また、HIVが極性を有する感染細胞から放出される場合、一定の方向からのみ放出されることも知られている⁴⁾。しかしながら、これら一連のメカニズムや宿主タンパク質の役割については、これまでほとんど解明されていない。そこで我々はGagと結合する宿主タンパク質をTAP法と呼ばれる手法で精製し、質量分析を行ったところ、APC（adenomatous polyposis coli）が未知のGag結合タンパク質であることが分かった（図2）。変異体を作製して詳細に解析すると、APCのC末端領域がGagのN末端領域と直接結合することが分かった。APCは家族性大腸腺腫症の原因遺伝子としても知られているが、主に極性細胞の突端部に局在し、さまざまなタンパク質やRNAの局在や制御に関与することが明らかとなってい

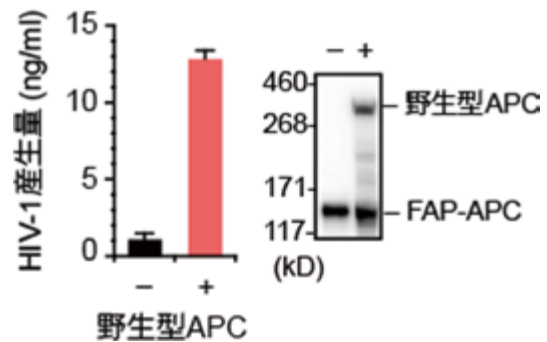


図3. APCによるHIVの産生促進

家族性大腸腺腫症（FAP）由来のAPC遺伝子変異細胞に野生型APCを過剰発現するとHIV産生量が約10倍以上亢進した。細胞におけるAPCの発現を示すウェスタンブロット像を右に示した。

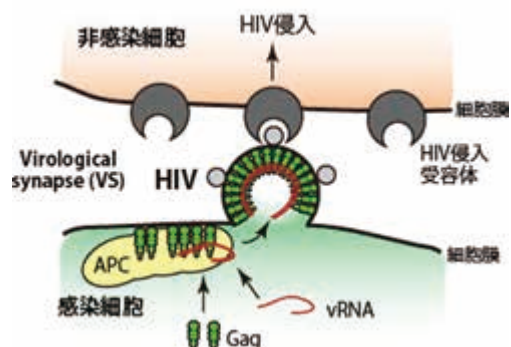


図4. APCによるHIV感染促進メカニズム

APCはVirological Synapse (VS)においてGagとvRNAの局在化に関与し、cell-to-cell感染を促進させる。

る⁵⁾。そこで我々はGag, vRNAの輸送や制御にAPCがどのように関わるのかを検討した。その結果、ウイルス感染細胞にAPCを過剰発現させると、HIV産生量が約6倍に上昇することが分かった。特に、家族性大腸腺腫症由来のAPC遺伝子変異を有する細胞に野生型APCを過剰発現すると、HIV産生量が約10倍以上亢進した（図3）。さらに、蛍光標識したGagやvRNAを用いてHIVのcell-to-cell感染について観察したところ、APCはGagおよびvRNAとともにVSに集積することがわかった。反対に、APCをノックダウンした細胞では、VSへのGagとvRNAの集積が減少し、それに伴ってHIVのcell-to-cell感染伝播効率の顕著な低下が認められた。これらの結果から、APCはウイルス構成因子であるGagおよびvRNAをVSに集積、安定化させることで、HIVのcell-to-cell感染を制御している宿主タンパク質であることが示唆された（図4）⁶⁾。ウイルスタンパク質に対するAPCの機能をうまく抑制することができれば、HIVのcell-to-cell感染伝播を抑制することができるかもしれない。

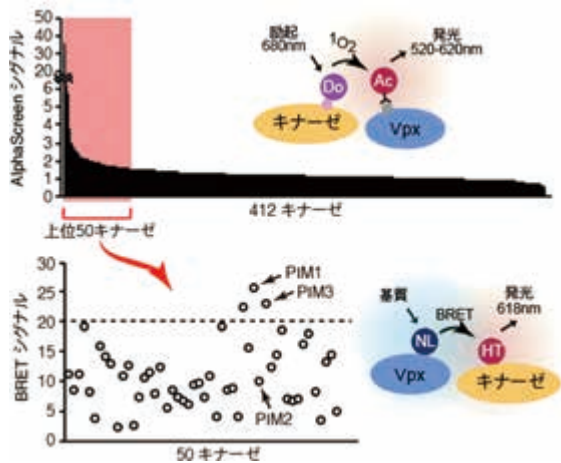


図5. Vpx結合タンパク質の同定

AlphaScreen法によりVpxと直接相互作用する宿主キナーゼを定量的に調べ、上位50種のキナーゼを抽出した。NanoBRET法によりVpxと細胞内で相互作用する宿主キナーゼを抽出し、PIMキナーゼがVpx結合タンパク質として同定された。

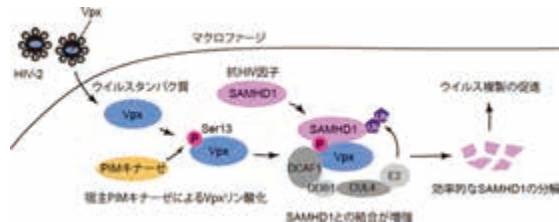


図6. PIMキナーゼによるHIV感染促進メカニズム

PIMキナーゼは細胞内に侵入したVpxをリン酸化し、生体防御因子SAMHD1との結合を促進する。結果として、SAMHD1が分解されて感染が促進される。

Ⅲ. HIVの機能活性化に関わる宿主因子PIMキナーゼ

ヒトの細胞はもともと、ウイルスに対するさまざまな防御手段をもっている。とくに、ウイルスに対して顕著な阻害活性をもつ宿主タンパク質を生体防御因子と呼び、HIVに限らず多様なウイルスの抑制が可能である。生体防御因子の一つSAMHD1 (SAM domain and HD domain containing protein 1) タンパク質は、dNTP分解酵素の一種で、静止期CD4陽性T細胞やマクロファージへのHIV感染を強く阻止することが知られている⁷⁾。ところが、西アフリカに感染者の多い2型HIV (HIV-2) は、ウイルス粒子内にVpx (Viral protein X) タンパク質をもっており、その働きにより細胞内でSAMHD1を分解することができる。結果としてHIV-2は静止期CD4陽性T細胞やマクロファージに1型HIV (HIV-1) よりも効率よく感染することができる⁸⁾。我々は、新しい抗HIV薬の開発を目指す過程で、Vpxの機能を抑制すれば、ヒトが本来有する生体防御因子の抗ウイルス活性によってHIV-2を抑制できるのではないかと考えた。そこでまずはVpx

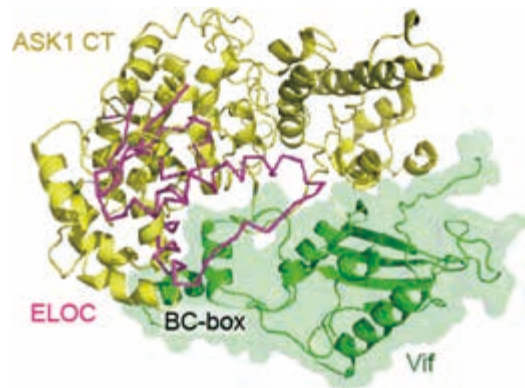


図7. ASK1とVifの結合シミュレーション

Vifとの結合に重要なASK1のC末端領域 (ASK1 CT) をモデリングし、Vifとのドッキングシミュレーションを行った。VifがAPOBEC3Gを分解する際に必要な補助因子であるElongin C (ELOC) の結合領域にASK1が相互作用する可能性が示唆された。



図8. ASK1によるHIV感染阻害メカニズム

生体防御因子APOBEC3G (A3G) はVifタンパク質によってユビキチン化され分解されるが、ASK1はこれを阻害することでA3Gの活性を高めることができる。

のSAMHD1に対する働きを制御する因子の探索を行った。これまでの報告から、Vpxは細胞内でリン酸化修飾を受けることが知られていたため⁹⁾、これがSAMHD1に対する働きを制御する可能性を考えた。そこでリン酸化修飾に関わる400種類以上の宿主タンパク質群のうち、Vpxと相互作用するものをAlphaScreenとNanoBRETと呼ばれるアッセイ法でそれぞれ探索したところ、PIMキナーゼと呼ばれるリン酸化酵素が、試験管内と生細胞内の両方でVpxと結合することがわかった (図5)。質量分析計を用いて詳しく調べたところ、Vpxの13番目のアミノ酸であるセリンがPIMキナーゼによりリン酸化されることが分かった。このセリンを別のアミノ酸に置換すると、Vpxのリン酸化が起きなくなり、ウイルスの増殖が顕著に減少した。また、分子動力学を用いた構造シミュレーションの結果、このセリンのリン酸化はSAMHD1との相互作用を強めることが予測され、生化学実験でそれが実証された。次に、siRNAを用いてPIMキナーゼの発現を抑制した細胞にHIV-2を感染させたところ、ウイルスの感染は低く抑えられた。この細胞ではVpxが存在する

にも関わらず、細胞内のSAMHD1がほとんど分解されておらず、SAMHD1による抗ウイルス活性が持続していたと考えられた。既知のPIMキナーゼ阻害薬の一つAZD1208¹⁰⁾を、HIV-2を感染させたマクロファージに添加すると、長期間にわたりウイルスの増殖が抑制された。このことから、AZD1208という既存の抗がん剤に、HIVタンパク質Vpxの機能阻害という作用もあることが明らかとなり、いわゆるドラッグリポジショニングによる新規抗ウイルス剤の可能性が示された。これらの結果から、宿主PIMキナーゼがVpxのSAMHD1に対する働きを制御するウイルス調節因子であることが明らかとなった(図6)。霊長類モデルを用いたex vivo実験でもPIMキナーゼ阻害剤はHIV-2の複製を効果的に阻止できることが分かっている¹¹⁾。

IV. 生体防御因子の働きを助ける宿主因子ASK1

最後の項は、ウイルスに対して抵抗性を示す生体防御因子について詳しく述べようと思う。HIVだけでなくB型肝炎ウイルスにも顕著な抗ウイルス活性を示すAPOBEC3G (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3G) という生体防御因子がある。APOBEC3Gは核酸編集酵素であるが、HIVやHBV感染細胞内では強力な逆転写酵素阻害因子として働く。HIVは感染細胞内で自身のゲノムをRNAからDNAへと逆転写するが、APOBEC3Gはその際にウイルス遺伝子に過剰に変異を入れてHIV複製を抑制することができる。しかしHIVは、Vif (Viral infectivity factor) と呼ばれるウイルスタンパク質の働きでAPOBEC3Gを細胞内でユビキチン化し、分解することができ、結果としてAPOBEC3Gから回避している¹²⁾。ところが、さまざまな予備実験から、細胞にある種のストレスを与えるとVifの働きが一時的に弱まることが分かった。そこでストレスを感知する情報伝達タンパク質群に着目して詳しく調べたところ、ASK1 (apoptosis Signal-regulating kinase 1) と呼ばれるストレス応答因子が発現した細胞では、VifによるAPOBEC3Gの分解が起こらないことが分かった。さらにASK1がVifと特異的に結合することが分かり、この結合をコンピューター上でシミュレーションすると、ASK1はVifのBCボックス領域と呼ばれる部分と結合することが推測された(図7)。この領域は、VifがAPOBEC3Gを分解する際に必要な補助因子であるElongin Cの結合に重要な場所であった。そこで実際にASK1を発現させた細胞でVifとElongin Cの結合を調べたところ、確かに両者の結合が失われていた。これらの結果から、ASK1がVif-Elongin Cの結合を競合的に阻害することで、Vifの機能を失わせる因子である可能性が示唆された。次に、ASK1を過剰に発現したT細胞を作製

してHIV複製に対する影響を調べたところ、ウイルスの増殖が顕著に阻害されることが分かった。この細胞ではVifが存在するにも関わらず、細胞内のAPOBEC3Gが分解されておらず、またウイルスゲノムに多数の特徴的な変異が出現していたことから、ASK1はHIV感染細胞においてVif機能を阻害し、APOBEC3Gの抗ウイルス活性を亢進させる因子であることが分かった(図8)。一方、ASK1はストレス応答因子であることから、我々は薬剤刺激に応じてASK1の発現や機能が向上するのではないかと考えた。そこでいくつかの薬剤をT細胞に処理したところ、既存の抗HIV薬、逆転写酵素阻害剤の一つアジドチミジンがASK1の発現を増加させることが分かった。実際にアジドチミジンを添加したT細胞では、Vifの活性も低下していた。これらの結果から、アジドチミジンには本来の逆転写酵素阻害剤としての効果だけでなく、ASK1を介したVifの機能阻害という予想外の作用があることが分かった¹³⁾。

V. おわりに

感染細胞内におけるウイルスタンパク質とヒトタンパク質との複雑な相互作用は無数に行われており、その全貌はいまだ不明である。これらの複雑な相互作用は、単にウイルスの複製だけでなく、ウイルスの潜伏感染や再活性化にも関わることが明らかとなっている。HIVは適切な投薬治療によりコントロール可能なウイルスだが、投薬を中止すると体内に僅かに存在する潜伏感染細胞から再びウイルスが増殖し始めるため、感染者は生涯薬剤を飲み続ける必要がある。HIV感染症の根治療法を開発するためには、ウイルスの潜伏化や再活性化に関わるウイルス-宿主相互作用を同定し、新規薬剤標的としての可能性を模索し続けることが重要であると考えている。

VI. 謝 辞

本研究はすべて横浜市立大学医学部微生物学の梁明秀先生のご指導のもと行われたものです。この場を借りて心より感謝申し上げます。また本研究の遂行にあたり技術面で多大なご支援を頂きました。横浜市立大学プロテオーム解析センターの木村弥生先生、愛媛大学プロテオサイエンスセンターの澤崎達也先生、国立感染症研究所感染症疫学センターの加納和彦先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Jolly C, Kashefi K, Hollinshead M, et al.: HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J Exp Med*, **199**: 283–293, 2004.

- 2) Agosto LM, Herring MB, Mothes W, et al.: HIV- 1 - Infected CD 4 + T Cells Facilitate Latent Infection of Resting CD 4 + T Cells through Cell-Cell Contact. *Cell Rep*, **24**: 2088 – 2100, 2018.
- 3) Freed EO: HIV- 1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol*, **13**: 484 – 496, 2015.
- 4) Llewellyn GN, Hogue IB, Grover JR, et al.: Nucleocapsid promotes localization of HIV- 1 gag to uropods that participate in virological synapses between T cells. *PLoS Pathog*, **26**: e1001167, 2010.
- 5) Mili S, Moissoglu K, Macara IG: Genome-wide screen reveals APC-associated RNAs enriched in cell protrusions. *Nature*, **453**: 115 – 119, 2008.
- 6) Miyakawa K, Nishi M, Matsunaga S, et al.: The tumour suppressor APC promotes HIV- 1 assembly via interaction with Gag precursor protein. *Nat Commun*, **8**: 14259, 2017.
- 7) Goldstone DC, Ennis-Adeniran V, Hedden JJ, et al.: HIV- 1 restriction factor SAMHD 1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature*, **480**: 379 – 382, 2011.
- 8) Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, et al.: Vpx relieves inhibition of HIV- 1 infection of macrophages mediated by the SAMHD 1 protein. *Nature*, **474**: 658 – 661, 2011.
- 9) Rajendra Kumar P, Singhal PK, Subba Rao MR, et al.: Phosphorylation by MAPK regulates simian immunodeficiency virus Vpx protein nuclear import and virus infectivity. *J Biol Chem*, **280**: 8553 – 8563, 2005.
- 10) Dakin LA, Block MH, Chen H, et al.: Discovery of novel benzylidene-1,3-thiazolidine-2,4-diones as potent and selective inhibitors of the PIM-1, PIM-2, and PIM- 3 protein kinases. *Bioorg Med Chem Lett*, **22**: 4599 – 4604, 2012.
- 11) Miyakawa K, Matsunaga S, Yokoyama M, et al.: PIM kinases facilitate lentiviral evasion from SAMHD 1 restriction via Vpx phosphorylation. *Nat Commun*, **10**: 1844, 2019.
- 12) Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, et al.: Isolation of a human gene that inhibits HIV- 1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, **418**: 646 – 650, 2002.
- 13) Miyakawa K, Matsunaga S, Kanou K, et al.: ASK 1 restores the antiviral activity of APOBEC 3 G by disrupting HIV- 1 Vif-mediated counteraction. *Nat Commun*, **6**: 6945, 2015.

Abstract

IDENTIFICATION OF HOST PROTEINS THAT REGULATE HIV REPLICATION

Kei MIYAKAWA

Department of Microbiology, Yokohama City University School of Medicine

Human immunodeficiency virus (HIV) is the causative agent of acquired immunodeficiency syndrome. The replication of HIV within the host is dependent on various cellular proteins. Over the last few years, we have extensively searched for human proteins that interact with viral proteins using various techniques, and have clarified the mechanisms by which HIV replicates in cells. In this paper, we outline the clever strategies employed by virus to hijack host proteins for efficient replication that were revealed by our research and also suggest possible approaches for developing novel therapeutics.